

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450421

研究課題名(和文)猫多発性嚢胞腎の病態解明と新規治療薬に関する研究

研究課題名(英文)The clarification of pathogenesis in polycystic kidney caused by feline PKD1 gene mutation and the specific therapy for PKD cats.

研究代表者

佐藤 れえ子(Sato, Reeko)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80142892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：猫多発性嚢胞腎の嚢胞形成機序を明らかにするために、腎嚢胞細胞PKD1遺伝子変異によるツーヒット変異を証明し、嚢胞細胞増殖シグナル伝達経路をブロックする分子標的薬を決定して、猫における至適投与量を模索した。その結果、嚢胞ネットワークを通じて全国より血液検体と死亡症例の腎臓を収集でき、PKD1遺伝子のPCR-RFLP法とダイレクトシーケンスによる遺伝子検査の結果、腎嚢胞細胞PKD1遺伝子にホモ型変異を検出し(エクソン29、c.9891)ツーヒット変異が生じていることを明らかにした。治療薬にはcAMP pathwayを抑制するトルバプタンを選択し、短期投与と長期投与を実施して投与量を決定した。

研究成果の概要(英文)：On the purpose of clarification of renal cyst formation in feline polycystic kidney disease (fPKD), PKD gene mutation (Exon29, c.10063, C>A) in cyst epithelium was analyzed and two-hit theory was discussed. Furthermore, molecularly-targeted drug for fPKD was selected and the clinical dosage for fPKD was also investigated.

Many blood samples and PKD kidney samples were collected through the feline polycystic kidney network, and PCR-RFLP analysis and direct sequence of PKD1 were performed. Homozygous mutation of PKD1 was found in cyst epithelium (somatic cell) suggesting two-hit mutation. Tolvaptan, orally active vasopressin V2 receptor antagonist, was selected for the molecularly-targeted therapy for fPKD and short-term and long-term administration of tolvaptan were performed in healthy cats for decision of clinical dosage.

研究分野：獣医内科学

キーワード：常染色体優性多発性嚢胞腎 PKD1遺伝子 猫 ツーヒット トルバプタン ポリシスチン CFTR

1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) は、人では難病指定されている遺伝性疾患である。この病態が人以外の動物である猫にも存在することが近年明らかになってきた。

ADPKD は PKD1・PKD2・PKD3 の遺伝子異常によって、腎臓や肝臓など特定の臓器に後発的に嚢胞を形成し、内部に液を分泌するのが大きな特徴である。これまでの研究で ADPKD のモデルとして開発された PKD1 ノックアウトマウスやノックアウトキメラマウス、トランスジェニックメダカでは、長期間かけて形成される嚢胞腎の再現には至らなかった。猫の PKD では人と同様に



嚢胞は次第に数と大きさを増してゆき、中年齢以降に腎不全症状を呈するようになる(日本猫雑種、雄、申請者ら、日本獣医師会誌、63、2010)。猫では PKD1 のヘテロ型ミスセンス変異 exon29, position 3284, C>A が証明されている。したがって、猫 PKD は人の ADPKD の良いモデルであると考えられている。

このように PKD1 遺伝子の変異が引き金になることは示されたものの、何故嚢胞形成が長い経過を経て次第に重症化するのか、その機序の解明はまだ解決されていない問題として残っている。この嚢胞形成の機序が明らかになれば、そこに作用する分子標的薬などの内科治療が可能となり、難病である多発性嚢胞腎の新たな治療法につながるものと考えられる。

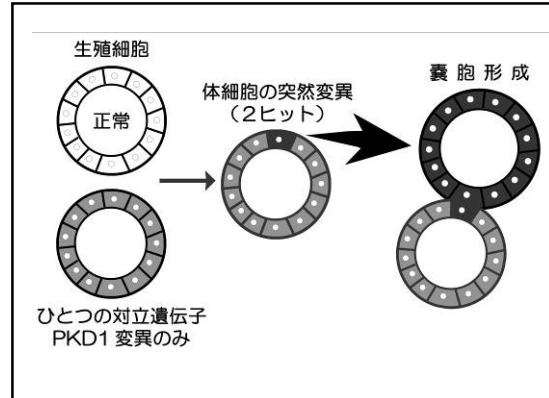
2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ本研究では、猫多発性嚢胞腎が ADPKD のモデル疾患であることを明らかにするために、病態の機序を解明し、最終的には分子標的薬の選択と症例への投与のための臨床的投与量の決定を行う目的で、以下の項目を明らか

にすることとした。

A) 猫多発性嚢胞腎の嚢胞細胞における PKD1 遺伝子のツーヒット変異の証明

猫多発性嚢胞腎症例の白血球および腎嚢胞上皮細胞 DNA の PKD1 遺伝子領域 (エクソン 29 領域、c. 9891 部位) でのヘテロ接合性の喪失を検出し、嚢胞細胞 (体細胞) におけるツーヒット説を証明する。



B) ポリシスチン蛋白 (PC) と CFTR の嚢胞形成への関与

嚢胞形成に PKD1 遺伝産物である PC と、溶液輸送に関わる CFTR が猫の嚢胞腎組織で嚢胞形成とどのように関連しているのかを明らかにする。このことは、次の目標項目である治療薬の選択を行うために必須の研究課題である。

C) 猫多発性嚢胞腎治療分子標的薬の選択と臨床的投与量の決定

3. 研究の方法

(1) 嚢胞ネットワークの構築およびサンプル収集

◎ 現在までに構築されている嚢胞腎ネットワークを通じて、症例の収集を行う。岩手大学嚢胞センターで実施している猫 PKD の遺伝子診断に寄せられた症例で、死後の献体を了承してくれた飼い主にも協力してもらう。この方法ですでに複数の献体を受けている。☞ ネットワーク構築とサンプル収集

- ◎ 血液サンプルからの DNA 抽出と PCR-RFLP 法ならびにダイレクトシーケンス法の実施
- ◎ 献体腎臓に関しては、囊胞液の分析（蛋白濃度、比重、無機成分濃度、NAG濃度、沈渣細胞の同定）
- ◎ 病理組織学的検索

(2) 猫多発性囊胞腎におけるツーヒット変異の証明

- ◎ 多発性囊胞腎症例の腎臓から凍結切片を作成し、マイクロダイセクションシステムを用いて、囊胞形成した尿細管上皮細胞をピンポイントで採取する。
- ◎ 単離した囊胞細胞から DNA を抽出し、エクソン 29 特異的な PKD 遺伝子のプライマーを用いて PCR を実施。PKD1 mRNA 遺伝子のオリゴヌクレオチドプライマーは、GenBank データベースに基づき設計した。
- ◎ PCR 産物に対する PCR-RFLP 法によるアガロースゲル電気泳動と、ダイレクトシーケンス法を実施し、PKD 遺伝子変異がヘテロ型（1 ヒット）なのか、それとも体細胞変異を起こしてホモ型（2 ヒット）に変化しているかを検証。エクソン 29 領域、c. 9891 部位でのヘテロ接合性の喪失の証明

☞ ツーヒット仮説の証明

(3) 猫囊胞腎細胞におけるポリシチン蛋白発現の観察

- ◎ 猫多発性囊胞腎における腎臓の病理組織学的検索を実施し、各種レクチン染色と E カドヘリン染色を行い囊胞細胞の由来を特定。この際、最適な猫の近位尿細管マーカーと遠位尿細管マーカーの選定を行い、小囊胞と大囊胞の由来尿細管部位を特定する。
- ◎ PC 蛋白に対するペプチド抗体の作成。変異部位(青矢印)を挟んだ C 末と N 末(赤矢印)をプローブにして作成。PC 抗体による囊胞組織の免疫染色

(4) 囊胞細胞における PC の mRNA の定量。マイクロダイセクションで切り出した囊胞細胞から RNA を抽出し、RT-PCR の実施とリアルタイム PCR により定量。☞ 囊胞増殖因子の特定

(5) 健康猫に対するトルバプタン投与と臨床投与量の決定

- ◎ 分子標的薬として cAMP pathway 阻害のバソプレシン V2 受容体拮抗薬トルバプタンを選択
- ◎ 健康猫
- ◎ 各種 dose を単回投与し、利尿効果の現れる投与量で、有害作用のない最大量を検索
- ◎ 健康猫に上記で決定した投与量を半年間連続投与し、有害作用を確認

4. 研究成果

(1) 囊胞ネットワークによるサンプルの収集

- ◎ 全国から血液サンプルならびに死亡した猫 PKD 症例の献体腎が収集できた。その結果、実施機関内に 377 の血液検体と 20 症例の献体腎を収集した。
- ◎ 血液サンプルから DNA 抽出後 PCR-RFLP 法を実施し、遺伝子変異陽性猫を抽出した。377 献体のうち遺伝子変異陽性だった検体は 150 例であった。
- ◎ 遺伝子変異陽性の猫の性差を検定したが、性差は認められなかった。
- ◎ 陽性猫の種類は、ペルシャ種の他に、スコティッシュ・ホールドやアメリカン・ショートヘアでも高率にみられ、日本猫雑種や洋猫雑種にも高率に認められた。したがって、日本においてはペルシャ以外の猫種にも猫 PKD の症例が多数存在すると思われた。
- ◎ また、ホームページに飼い主と繁殖者向けに猫 PKD に関する啓発資料を掲載し、遺伝子変異陽性猫の繁殖を行わないよう情報発信した。

(2) 猫 PKD におけるツーヒット変異

- ◎ 猫 PKD の囊胞上皮細胞の PKD1 遺伝子（エクソン 29 領域、c. 9891 部位）に「ヘテロ接合性の消失」を検出し、ツーヒット変異があることを明らかにした。

(3) PC と CFTR の囊胞細胞での発現

- ◎ これら 2 者の免疫染色を囊胞細胞に実施し観察したところ、小囊胞～中囊胞ではそれらの発現が良好に観察されるが、大囊胞では殆ど観察されなくなっていた。したがって囊胞細胞が盛

んに分裂している時期に CFTR 発現が高度にみられることが明らかになった。

(4) トルバプタンの健康猫への投与

- ◎ 上記の研究成果を基に猫 PKD の治療薬として cAMP pathway 阻害のバソプレシン V2 受容体拮抗薬トルバプタンを選択し、その臨床治療量を決定するための基礎情報の取得のため、各種の投与量のトルバプタンを健康猫に単回投与した。その結果利尿効果が充分観察され、高 Na 血症などの電解質異常も認められない投与量が明らかになった。
- ◎ 同量を6か月間健康猫に投与し、定期的に血液と尿を採取して分析してトルバプタンの長期投与の影響を観察した結果、トルバプタン投与による有害作用は一切認められなかった。

今後はトルバプタンを実際の猫 PKD 症例に対して投与し、その効果を確認することとした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 小林沙織、内田直宏、佐藤れえ子 (2017) ネコ常染色体優性多発性嚢胞腎における PKD1 遺伝子解析および体細胞遺伝子変異の検出. 第60回日本腎臓学会学術総会(仙台) 日本腎臓学会誌 59:288.
- ② 内田直宏、小林沙織、佐藤れえ子 (2017) ネコ常染色体優性多発性嚢胞腎における腎容積に関する検討. 第60回日本腎臓学会学術総会(仙台) 日本腎臓学会誌 59:288.
- ③ 佐藤れえ子、内田直宏、小林沙織 (2017) ネコ常染色体優性多発性嚢胞腎の疫学的特徴. 第60回日本腎臓学会学術総会(仙台) 日本腎臓学会誌 59:277.
- ④ 佐藤れえ子 (2017) 猫の慢性腎臓病に対するプロスタサイクリン誘導体制剤による新しい治療アプローチ □一猫の慢性腎臓病レビューと新たなアプローチの着想- 第13回日本獣医内科学アカデミー学術

大会講演要旨 1 : 273-274.

- ⑤ 羽生奈々、内田直宏、小林沙織、戸塚美奈子、井口愛子、山崎真大、佐藤れえ子 (2016) ネコ多発性嚢胞腎遺伝子検査を実施した 357 例における疫学的特徴と遺伝子異常の関連性. 第18回メープル小動物臨床検討会-要旨集: 27-29.
- ⑥ 小山 峻弘、岩間 優子、加藤 安美、内田 直宏、小林 沙織、山崎 真大、佐藤 れえ子 (2016) ネコの多発性嚢胞腎における腎容積の検索. 第9回日本獣医腎泌尿器学会学術集会講演要旨集: 15-16.
- ⑦ 佐藤れえ子 (2016) 「猫の多発性嚢胞腎の最新知見」. 平成27年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会講演要旨 PDF ファイル (ページなし).
- ⑧ 岩間優子、川名悠加、山田修造、加藤安美、小山峻弘、内田直宏、小林沙織、山崎真大、佐藤れえ子 (2016) 猫の腎疾患における腎容積に関する検討-健康猫と腎疾患猫の比較-. 第12回日本獣医内科学アカデミー学術大会抄録集 1 : 218
- ⑨ 山田修造、川名悠加、内田直宏、小林沙織、山崎真大、佐藤れえ子 (2015) 「CT を用いたネコの腎容積の測定と各種パラメーターの比較」. 第8回日本獣医腎泌尿器学会学術集会・総会講演要旨: 20-21.
- ⑩ 川名悠加、山田修造、内田直宏、小林沙織、山崎真大、佐藤れえ子 (2015) 「正常猫における腎臓サイズの評価法の探索」. 第8回日本獣医腎泌尿器学会学術集会・総会講演要旨: 22-23.
- ⑪ 川名悠加、山田修造、内田直宏、小林沙織、戸塚美奈子、山崎真大、佐藤れえ子 (2015) 「ネコ多発性嚢胞腎遺伝子検査を実施した 156 例における疫学的特徴と遺伝子異常の関連性」. 第158回日本獣医学会学術集会講演要旨: 395.
- ⑫ 山田修造、川名悠加、内田直宏、相原美紀、小林沙織、山崎真大、佐藤れえ子 (2015) 「バソプレッシン V₂ 受容体拮抗薬トルバプタンの健康ネコへの単回投与の影響」. 第158回日本獣医学会学術集会講演旨: 395.

- ⑬ 内田直宏、川名悠加、山田修造、内田直宏、小林沙織、山崎真大、佐藤れえ子(2015)「多発性嚢胞腎に対してトルバプタンの使用を開始した猫の一例」第158回日本獣医学会学術集会講演要旨：395、2015年9月、十和田。

〔図書〕(計 4件)

- ① 佐藤れえ子、緑書房、猫の臨床学 I 巻-猫多発性嚢胞腎の臨床徴候、2017、印刷中
② 佐藤れえ子、緑書房、猫の臨床学 I 巻-遺伝病としての猫多発性嚢胞腎、2017、印刷中
③ 佐藤れえ子、インターズー、犬と猫の治療ガイド2015、2015、381-382
④ 佐藤れえ子、インターズー、犬と猫の治療ガイド2015、2015、457-459

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~hospital/download/download.html#pkd_diagnosis
2. http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/%7Enaika/works/naika2_study.html#pkd
- 3.

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 れえ子 (SATO, Reeko)
岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80142892

(2)研究分担者

御領 政信 (GORYO, Masanobu)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：80153774

小林 沙織 (KOBAYASHI, Saori)
岩手大学・農学部・助教
研究者番号：60566214

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()